

Recombined-adenovirus accompanying virus production method and application

Patent number: CN1252441
Publication date: 2000-05-10
Inventor: WU XIAOBING (CN); WU ZHIJIANG (CN); HOU YUNDE (CN)
Applicant: NAT MAJOR LAB OF VIRUS & GENE (CN)
Classification:
- international: **A61K48/00; A61P43/00; C12N7/01; C12N15/33; C12N15/38; C12N15/861; A61K48/00; A61P43/00; C12N7/01; C12N15/33; C12N15/34; C12N15/861; (IPC1-7): C12N7/01; A61K48/00; C12N15/33; C12N15/38; C12N15/861**
- european:
Application number: CN19991019039 19990910
Priority number(s): CN19991019039 19990910

Also published as:

 CN1126816C (C)

[Report a data error here](#)

Abstract of CN1252441

The present invention provides an "one strain of carrier cell/one strain of auxiliary virus" method of producing recombined adeno-associated virus (AAV). The carrier cell strain is stable generation-passing cell strain with integrated redeemable recombined AAV DNA obtained by introducing combined AAV carrier plasmid containing exogenous gene expression unit into mammal cell and through resistancescreen. The auxiliary virus is recombined HSV-1 virus carrying AAV rep/cap gene. By utilizing the whole function auxiliary virus to infect carrier cell strain, a large amount of infective recombined AAV, can be produced, so that the present invention may be used in large-scale production of recombined AAV.

Data supplied from the [esp@cenet](#) database - Worldwide

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 7/01

C12N 15/861 C12N 15/33

C12N 15/38 A61K 48/00

//(C12N7/01, C12R

1:92)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99119039.4

[43]公开日 2000年5月10日

[11]公开号 CN 1252441A

[22]申请日 1999.9.10 [21]申请号 99119039.4

[71]申请人 病毒基因工程国家重点实验室

地址 100052 北京市宣武区迎新街100号基因室

[72]发明人 吴小兵 伍志坚 侯云德

权利要求书1页 说明书6页 附图页数0页

[54]发明名称 可用于大规模生产的重组腺病毒伴随病毒
生产方法及用途

[57]摘要

本发明提出一种“一株载体细胞/一株辅助病毒”生产重组 AAV 病毒的方法。其中载体细胞株是将含有外源基因表达单位的重组 AAV 载体质粒导入哺乳动物细胞,经抗性筛选获得的整合了可拯救的重组 AAV DNA 的稳定传代的细胞株。辅助病毒是携带 AAVrep/cap 基因的重组 HSV-1 病毒。用这种全功能辅助病毒感染载体细胞株即可产生大量有感染性的重组 AAV 病毒。本发明可用于重组 AAV 病毒的规模化高效生产。

ISSN 1008-4274

专利文献出版社出版

本发明属于生物技术发明领域，特别涉及用于基因治疗的重组腺病毒相关病毒载体（rAAV）的制备和用途。

1. 本发明的特征是采用“一株细胞/一株病毒”的方法制备 rAAV 病毒。
2. 用“一株载体细胞/一株全功能辅助病毒”的方法制备 rAAV 病毒，包括：
 - (a) 重组 AAV 载体细胞株的建立；
 - (b) 全功能辅助病毒的产生和制备；
 - (c) 用全功能辅助病毒感染载体细胞株，产生 rAAV 病毒。
3. 通过将重组 AAV 载体质粒导入哺乳动物细胞并经过抗性选择培养获得稳定传代的重组 AAV 载体细胞株。
4. 载体细胞株中含有稳定整合在染色体中的 AAV ITRs 及治疗基因表达单位。
5. 将 AAV 病毒 rep/cap 基因插入单纯疱疹病毒基因组中构成全功能辅助病毒。
6. 生产的 rAAV 病毒携带目的基因用于遗传病、肿瘤、心血管病、感染性疾病的基因治疗。
7. 根据权利要求 4，载体细胞来源于 BHK 细胞。
8. 根据权利要求 4，载体细胞来源于 KB 细胞、293 细胞、HeLa 细胞。
9. 根据权利要求 4，抗生素抗性基因由重组 AAV 载体质粒提供。
10. 根据权利要求 4，抗性基因由另一个质粒提供。
11. 根据权利要求 4，抗性基因为 neo 基因。
12. 根据权利要求 4，抗性基因为 hph 基因。
13. 根据权利要求 6，AAV 病毒 rep/cap 基因插入 I 型单纯疱疹病毒（HSV-1）基因组中。
14. 根据权利要求 6，AAV 病毒 rep/cap 基因插入 II 型单纯疱疹病毒（HSV-1）基因组中。
15. 根据权利要求 6，AAV 病毒 rep/cap 基因插入 I 型单纯疱疹病毒（HSV-1）基因组的 UL2 和/或 UL44 中。
16. 根据权利要求 6，AAV 病毒 rep/cap 基因插入单纯疱疹病毒载基因组的任何位点中。

可用于大规模生产的重组腺病毒伴随病毒生产方法及用途

：...：可用于大规模生产的腺病毒伴随病毒生产方法及用途

本发明属于生物技术发明领域，涉及重组腺病毒伴随病毒的生产方法及获得的产品的用途，尤其是在基因治疗和转基因动物领域的用途。本发明是中国专利 98101753.3（申请号）和 98120033.8（申请号）的延续。

基因传递系统（gene delivery system）是基因治疗研究和应用的核心技术，包括病毒载体系统和非病毒载体系统。病毒载体主要包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺病毒伴随病毒载体、单纯疱疹病毒载体等。其中腺病毒伴随病毒（adeno-associated virus, AAV）载体因其安全、稳定、既可感染分裂细胞又可感染不分裂细胞、感染效率高、可长期表达外源基因等优点而受到关注。

AAV 病毒是一种非致病性的微小病毒，基因组为 4680nt 的单链 DNA。AAV 病毒的生活周期有潜伏性感染和裂解性感染两种方式。AAV 病毒的裂解性复制需要辅助病毒如腺病毒或单纯疱疹病毒（herpes simplex virus, HSV）的参与。在没有辅助病毒存在时，AAV 病毒以前病毒方式整合在宿主细胞染色体中。AAV 基因组的末端分别有 145nt 的 ITR 序列，该序列是 AAV 病毒必需的顺式作用元件，在 AAV 病毒基因组的拯救、复制、包装和整合等功能中具有重要作用。两个 ITR 之间为反式作用的 rep 和 cap 基因，对 AAV 病毒 DNA 的复制和病毒颗粒的产生是必不可少的。Rep 基因编码 4 种蛋白：Rep78, Rep68, Rep52, Rep40，与 AAV 病毒的复制、整合、拯救等功能有关。Cap 基因编码 3 种外壳蛋白，VP1，VP2，VP3，构成 AAV 的 20 面体外壳。

Samulski RJ 等（Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2077-2031, 1982）将完整的双链 AAV DNA 克隆于 pBR322 质粒中，发现位于质粒中的 AAV 前病毒基因组亦具有感染性。因此将外源基因表达单位置于 AAV 病毒的两个 ITR 之间，而 rep 和 cap 基因及辅助病毒的功能则由其它方式反式提供，在细胞中可获得含有外源基因的重组腺病毒伴随病毒（recombinant adeno-associated virus, rAAV）。

经典的 rAAV 产生方法是用双质粒共转染 293 细胞以及辅助病毒如 5 型腺病毒 (Ad5) 感染。双质粒中一个是重组 AAV 载体质粒, 另一个为含有 AAV rep/cap 基因的辅助质粒。由于这种方法操作较复杂, 影响 rAAV 产生的因素多, 难以获得高滴度的 rAAV, 不易于扩大生产规模, 因此许多研究者致力于改进 rAAV 的产生方法。这些改进包括以下几类: 1) 将 rep/cap 基因转导到细胞株中, 建成一种包装细胞系。其中的 rep/cap 的表达受其自身的启动子控制, 或换成其它组成型或可诱导启动子。2) 将 AAV ITRs 和其间的外源基因表达单位 DNA 插入腺病毒基因组中, 构建成为一种嵌合型重组腺病毒。3) 将 AAV ITRs 和其间的外源基因表达单位 DNA 置于自主复制的 EBV 病毒载体中, 转导至细胞中, 建成一种携带具有自主复制能力的重组 AAV 载体质粒的细胞株。4) 将 rep/cap 基因插入腺病毒基因组中, 构建成为一种具有完全辅助功能的重组腺病毒。然而许多实验证明, 这种思路难以实现。可能是由于 rep 蛋白对腺病毒的强烈抑制作用使得含有 rep/cap 基因的重组腺病毒无法产生。5) 用 HSV 病毒扩增子携带 rep/cap 基因, 产生具有完全辅助功能的 HSV 混合病毒。

尽管在 rAAV 产生方法上的各种改进都不同程度地提高了 rAAV 病毒的产量或简化了其制备方法, 然而这些方法仍然没有很好地解决 rAAV 病毒的规模化高效生产问题。目前要制备足够人体试验用量的 rAAV 病毒成本 (包括时间成本和资金成本) 仍然极高。因此发明一种可用于大规模高效生产 rAAV 病毒的方法十分必要。

本发明的目的在于提出一种可用于大规模制备的高效重组腺病毒伴随病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体的生产方法, 即“一株载体细胞/一株辅助病毒”的生产方法。该方法具有产量高、操作简便、易于进行规模化和工艺化生产的特点。本发明可用于进行重组 AAV 病毒的大量生产, 生产的重组 AAV 病毒可用于各种疾病的基因治疗。

制备 rAAV 病毒的传统方法是用双质粒共转染 293 细胞及用辅助病毒 (5 型腺病毒) 感染细胞。其中双质粒包括重组 AAV 载体质粒如 pAB11 和含有 AAV rep/cap 基因的辅助质粒如 pAd8。这种方法由于要对细胞进行转染, 因此具有转染效率低或不稳定、操作复杂、不易于扩大规模和工艺化的缺点。虽然经过改进, 用磷酸钙共沉淀方法可使 293 细胞的转染效率达到或接近 100%, 但转染方法难以用于大量的细胞及对 293 细胞本身的要求 (代次低于 50 代,

细胞呈扁平状, 倍增时间为 36hr~48hr) 限制了用该方法获得大批量的 rAAV 病毒。

针对目前在 rAAV 生产中影响因素多、操作复杂、不利于规模化生产、从而难以获得高产量的 rAAV 病毒的弊病, 本发明提出了“一株载体细胞/一株辅助病毒”的生产策略: 用携带了 AAV 病毒 rep/cap 基因的重组 HSV-1 病毒 (HSV1-rc) 感染稳定整合了重组 AAV 载体 DNA 的生产细胞株, 从病变的细胞中可获得大量的 rAAV 病毒。HSV1-rc 病毒可同时提供 rAAV 包装所必需的辅助病毒 HSV-1 及反式作用蛋白 Rep 及外壳蛋白, 这两种功能通常是由野生型辅助病毒如 Ad5 或 HSV-1 及含有 rep/cap 基因的辅助质粒如 pAd8 提供。被包装进入重组 AAV 病毒颗粒中的重组 AAV 基因组 DNA (单链) 来源于重组 AAV 载体细胞株。重组 AAV 载体细胞基因组中稳定整合了一个或多个拷贝的重组 AAV 载体 DNA, 其中包含 AAV 病毒的两个 ITR 序列及位于其间的治疗基因表达单位。治疗基因表达单位由真核表达启动子 (如 HCMV IE 启动子、SV40 启动子、 β 珠蛋白基因启动子、可诱导启动子、各种组织特异性启动子等)、治疗基因、mRNA 加尾信号组成, 长度不超过 5.0kb。

用 rHSV-rc 病毒感染载体细胞株时, HSV1-rc 病毒进入细胞后其 DNA 大量复制并最终产生子代病毒。HSV1-rc 病毒 DNA 复制时携带的 rep/cap 基因亦同步复制, 从而产生高拷贝的 rep/cap 基因。rep 基因编码产生 4 种 Rep 蛋白 (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40), 使重组 AAV 载体 DNA 从细胞基因组上拯救出来并大量复制最终成为单链被包装到 AAV 壳粒中; cap 基因编码 3 种外壳蛋白 VP1, VP2, VP3, 在细胞核内组装成壳粒。

本发明产生 rAAV 病毒的过程与野生型 AAV 病毒在 HSV-1 为辅助病毒的情况下裂解性感染和增殖的过程十分相似, 不同之处在于野生型的 AAV 病毒基因组的 ITRs 之间是 rep/cap 基因, 辅助病毒是野生型的 HSV-1; 而本发明将 rep/cap 基因插入到辅助病毒 HSV-1 的基因组中, 获得具有完全辅助功能的重组 HSV-1 病毒 rHSV1-rc; AAV 的 ITRs 及其间的治疗基因表达单位则由载体细胞株提供。用 rHSV1-rc 感染从载体细胞克隆中筛选出来的 rAAV 病毒产量高的单克隆细胞株, 在一定的条件下可获得与野生型 HSV-1 辅助野生型 AAV 产生效率相近的 rAAV 病毒产生效率, 用 BHK 细胞作为生产细胞时 rAAV 病毒产生率可达 10^{4-5} particles rAAV/cell。

rAAV 病毒的大量生产分 4 个步骤进行: a) HSV1-rc 病毒的大量生产。由于该病毒具有复制能力, 很容易在 BHK 细胞或其它敏感细胞上大量培养, 被感染的细胞将发生明显病变, 在上清和细胞中都存在大量的有感染性的 HSV1-rc 病毒。上清中 HSV1-rc 病毒滴度可达到 10^7 pfu/ml; 冻融法裂解细胞可得到 10^8 pfu/ml HSV1-rc 病毒。对获得的病毒液经过低速离心除去

细胞碎片就可用于下一步；b) 大量培养载体细胞株。可采用转瓶培养、细胞发酵罐培养及其它高密度培养细胞的设备和方法；c) 用 HSV1-rc 感染大量培养的载体细胞株。细胞发生完全病变后，裂解细胞得到的细胞裂解液，其中即含有大量的 rAAV 病毒。d) rAAV 病毒的分离纯化。

本发明涉及携带 AAV 病毒 *rep/cap* 基因的重组 HSV-1 病毒 HSV1-rc 的制备及携带重组 AAV 载体的生产细胞株的建立。HSV1-rc 病毒的制备方法和用途在中国专利 98120033.8 (申请号) 中已有论述。HSV1-rc 的产生是在对 HSV1 病毒全基因组分成 5 个大片段 (其末端序列依次有部分重叠) 插入其中的一套粘性质粒 (Set C 粘粒, 包括 *cos6*, *cos14*, *cos28*, *cos48*, *cos56*) 进行操作的基础上实现的。首先, 用体外重组 DNA 技术将 AAV-2 病毒的 *rep/cap* 基因插入其中一个粘粒的 HSV-1 基因组中, 例如插入 *cos6* 的 HSV1 UL2 基因中构建成 *cos6-rcΔUL2*; 插入 *cos56* 的 HSV1 UL44 基因中构建成 *cos56-rcΔUL44*。亦可将 *rep/cap* 基因插入 HSV-1 基因组的其它位置。上述过程在大肠杆菌中实现。将插入了 *rep/cap* 的重组粘粒 DNA 与相应的其余 4 个粘粒 DNA 一起用 *Pac I* 酶切 (切下粘粒骨架部分), 用酚/氯仿抽提纯化酶切的 DNA, 用脂质体方法或其它转染方法将其转染至 BHK-21 细胞或其它对 HSV1 病毒感染敏感的细胞中, 5~7 天后可观察到细胞出现病变和蚀斑, 表明 5 个 HSV1 片段在细胞中发生同源重组产生了重组 HSV1。分别挑取单个蚀斑进行检测, 包括用 PCR 方法检测其中 *rep* 基因和 *cap* 基因片段, 并检测其包装 rAAV 的功能。检测结果为阳性的即为插入了 *rep/cap* 基因的重组 HSV1 病毒 (HSV1-rc)。对获得的 HSV1-rc 进行两次空斑纯化, 以保证其纯一性。

携带重组 AAV 载体的生产细胞株即载体细胞株的建立: 将含有重组 AAV 载体 DNA (AAV ITRs 及其间的治疗基因表达单位) 的质粒用脂质体方法或其它转染方法导入细胞中, 再经过新霉素类似物 G418 选择培养获得抗性细胞克隆。分别挑取单克隆细胞并扩大培养, 筛选出在 HSV1-rc 感染下能产生高滴度 rAAV 病毒的稳定传代细胞株, 大量冻存备用。选择基因 *neo* 可在重组 AAV 载体质粒上, 位于 AAV ITRs 之间或在其之外的质粒骨架上; *neo* 也可以在另一个质粒如 pSV2neo 上, 用其与重组 AAV 载体质粒共转染细胞。

本发明的方法中 BHK-21 细胞是一种良好的 rAAV 生产细胞株。其它细胞如 293 细胞、KB 细胞、HeLa 细胞也可用来产生 rAAV。

本发明产生的 rAAV 病毒中可携带各种目的基因。这些 rAAV 病毒可用于遗传病、肿瘤、心血管病、感染性疾病的基因治疗。

6. 本发明所具有的优点:

本发明提供的方法可用于 rAAV 病毒的大规模生产。本发明采用的“一种载体细胞株/一种辅助病毒”的策略,克服了传统方法及各种改进方法中的操作复杂、影响因素多或难以放大生产等弊病,极大地简化了影响 rAAV 产生的因素和生产过程。其中的载体细胞株和全功能辅助病毒 HSV1-rc 及均具有稳定传代和扩增的特性,有利于生产放大。rAAV 病毒产生过程中,AAV 病毒的 rep/cap 基因可随辅助病毒 HSV1-rc 的复制而复制成高拷贝,模拟了野生型 AAV 病毒复制的过程,有利于产生高滴度的 rAAV。

7. 本发明涉及的微生物菌种:

本发明涉及 HSV1-rc 制备中应用的微生物菌种包括 DH5 α /cos6-rc Δ UL2 和 DH5 α /cos56-rc Δ UL44,这两株菌株于 1998 年 9 月 24 日保存于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心,登记入册编号分别为 CGMCC No.0361-1 和 CGMCC No.0360-2。

8. 实施例:以下列举的实施例对本发明的可用于大规模生产的腺病毒伴随病毒生产方法及用途作了详细说明,但并不意味着限制本发明的内容。

实施例 1 携带报告基因 GFP 的重组 AAV 载体质粒的构建

1) pSNAV-1/GFP 的构建

GFP (绿色荧光蛋白)基因来源于 pGreen Lantern-1 (GIBCO BRL, #10642-015)。通用型 AAV 载体质粒 pSNAV-1 为本室构建 (中国专利申请号:)。

用 Not I 酶切 pGreen Lantern-1 质粒 DNA,回收 GFP 片段,插入 pcDNA2.1 质粒 (Invitrogen 公司)的相应位点中,构建成 pcDNA2.1/GFP(+/-)。将 GFP 转录方向与 T7 启动子方向相反的重组质粒命名为 pcDNA2.1/GFP(-)。用 EcoR I 和 Xho I 双酶切 pcDNA2.1/GFP(-),回收 GFP 片段,插入 pSNAV-1 的 EcoR I 和 Sal I 位点中,构建成 pSNAV-1/GFP。该质粒依次包括以下元件: ITR-CMV-GFP-SV40 polyA-ITR-SV40 启动子-neo-polyA-amp^R-E.coli ori。

2) pSNAV-2/GFP 的构建

GFP (绿色荧光蛋白)基因来源于 pGreen Lantern-1 (GIBCO BRL, #10642-015)。通用型 AAV 载体质粒 pSNAV-2 为本室构建 (中国专利申请号:)。

用 Kpn I 和 Xho I 双酶切 pcDNA2.1/GFP(-),回收 GFP 片段,插入 pSNAV-2 的 Kpn I 和

Sal I 位点中, 构建成 pSNAV-2/GFP。该质粒依次包括以下元件: ITR-CMV-GFP-SV40 polyA-SV40 启动子-neo-polyA- ITR-amp^r-E.coli ori。

该质粒与 pSNAV-1/GFP 的主要不同之处在于, 在 pSNAV-1/GFP 中, neo 基因的表达单位位于两个 ITR 序列之内; 而 pSNAV-2/GFP 中, neo 基因的表达单位位于两个 ITR 序列的之外。

实施例 2 AAV-GFP 病毒载体细胞株的建立

分别用 pSNAV-1/GFP 和 pSNAV-2/GFP 质粒转染 BHK 细胞经选择培养得到两株 AAV-GFP 病毒载体细胞株 BHK/pSNAV-1/GFP 和 BHK/pSNAV-2/GFP。

BHK 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液 37℃ 培养。将 pSNAV-1/GFP 和 pSNAV-2/GFP 质粒分别用脂质体 lipofectamine (GIBCO BRL) 转染 BHK 细胞, 24hr 后消化, 1:2-5 传代。加 G418 800μg/ml 选择培养。10 天后可形成明显抗性细胞克隆。在倒置荧光显微镜下观察细胞克隆, 挑取有绿色荧光的单细胞克隆各 20 个分别扩大培养并分别冻存保种。用全功能辅助病毒 HSV1-rc 感染各株克隆化细胞, 检测发现各株细胞都不同程度地产生重组 AAV-GFP 病毒。分别测定重组 AAV-GFP 病毒的滴度。挑选出重组 AAV 病毒滴度高的细胞株作为 AAV-GFP 病毒载体细胞株。由载体细胞株 BHK/pSNAV-1/GFP 包装出来的重组 AAV 病毒颗粒中的基因组 DNA (单链) 长约 1600nt, 由两端 ITR 和其间的 CMV-GFP-SV40 polyA 组成。而由载体细胞株 BHK/pSNAV-2/GFP 包装出来的重组 AAV 病毒颗粒中的基因组 DNA (单链) 长约 3700nt, 由两端 ITR 和其间的 CMV-intron-GFP-SV40 polyA-SV40 promoter-neo-polyA 组成。

实施例 3 制备重组 AAV-GFP 病毒

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液 37℃ 培养细胞。将 5×10^6 载体细胞 BHK/pSNAV-1/GFP 接种于 15-cm 培养板中, 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 48hr。加全功能辅助病毒 HSV1-rc 1ml (moi = 0.5-1), 吸附 1hr。加含 2% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液至 30ml/培养板。37℃ 培养 36-48hr。收集培养上清和细胞, 反复冻融 4 次裂解细胞, 用 1500rpm 离心 10min, 取上清, 56℃ 灭活辅助病毒。用硫酸铵盐析法浓缩 rAAV-GFP 病毒, 氯化铯梯度离心纯化。对 PBS 缓冲液透析除盐。保存于 4℃ 或加 5% 甘油或蔗糖保存于 -70℃。